

## 개 lymphoma (분자 생물학적 기법을 이용한 림프종의 감별진단 예)

박진호

전북대학교 수의과대학 내과학교실

암은 전통적으로 암세포의 조직병리학적 검사를 이용한 형태학적 기준을 토대로 진단되어져 왔습니다. 최근 들어 분자생물학의 발전은 암 발생의 기전에 대한 다양한 정보를 제공해 주고 있으며, 그 결과 암은 다양한 유전적 변화로 인하여 발생하는 유전자 변이 질병으로 정의되고 있습니다. 또한 이러한 암세포의 유전적 변화를 감지해 낸다면 암 진단의 효율성을 보다 높일 수 있는 것으로 보고되고 있습니다. 즉, 분자유전학(molecular genetics)적 기법을 암 진단에 적용하게 된다면, 검사하고자 하는 암세포가 어떠한 종류의 암세포인지, 또 검사하고자 하는 조직이 악성인지 반응성인지를 감별해 주는 데 보다 민감하고, 특이적이며, 또한 객관적인 자료를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료됩니다. 이러한 정보는 암 환자에 대한 치료방법의 수립, 예후의 판정, 그리고 치료 후 미세병변과약 등에 보다 효과적이라 할 수 있겠습니다. 여기에서는 개의 종양 중에서도 높은 발생률을 나타내고 있는 림프종을 위주로 하여, 이에 대한 분자유전학적 기법을 통한 접근의 일례를 이 장의 마지막 부분에 소개하고자 합니다.

### 서론

개의 림프종은 Malignant lymphoma 또는 Lymphosarcoma로도 불리우는 림프-증식성 질병으로서 그 면역표현형에 따라 B-cell 기원과 T-cell 기원의 림프종으로 나눌 수 있습니다. 림프종은 일반적으로 림프절, 비장, 골수 등과 같은 lymphoreticular 세포에서 기원됩니다. 현재 국내의 개 림프종에 대한 발생 보고에 대한 명확한 통계학적 조사보고는 이루어지지 않고 있는 실정입니다. 미국의 예를 들어보면, 100,000마리 중 13-24마리의 개가 림프종이 발생되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 발생하는 연령도 1년령 이하에서는 100,000마리당 1.5마리이지만, 10년령 이상에서는 84마리로 고령의 연령에서 그 발생률이 증가되는 것으로 보고 되어 있습니다. 또한, 개에서 발생하는 모든 종양 중에서 림프종이 차지하는 비율은 약 7-24%까지이며, 혈액기원성 종양의 83% 이상을 차지한다고 보고되고 있습니다. 호 발되는 종-소인을 살펴보면 boxer, basset hounds, St. Bernards 등에서 다발하는 것으로 보고되고 있으며, Dachshunds나 Pomeranians 종에서는 그 발생이 적은 것으로 보고되고 있습니다.

### 병인론

림프종의 병인론에 대하여는 아직까지도 명확한 밝혀져 있지는 않습니다. 다만 발암 바이러스(oncogenic virus)로 잘 알려져 있는 retrovirus가 개 림프종 조직의 세포배양물에서 검출되기는 하였지만, 아직까지도 이에 대해서는 명확하지는 않습니다. 그리고 제초제도 림프종의 발생원인으로 제시되고 있는데, 2,4-D로 알려져 있는 제초제에 노출된 경력의 림프종 이환 개에서 N-ras 발암유전자의 변형이 높은 비율로 관찰되었다고 합니다. 또한, 면

역-매개성 혈소판 감소증에 이환된 환자의 경우, 림프종이 발생하는 경우가 상대적으로 높았다고 합니다.

### 림프종의 분류

림프종은 크게 발생 부위에 따른 해부학적 형태와 림프종 세포의 조직학적 특징을 기준으로 구분하고 있습니다. 먼저 림프종의 발생 부위를 기준으로 하는 해부학적 분류로는, 림프종의 80% 이상을 차지하는 다-중심성(Multi-centric)형, 위/장관(Alimentary)형, 종격형(Cranial mediastinal)형, 그리고 피부(Cutaneous)형으로 나누고 있습니다. 이에 대한 세부적인 설명은 생략하도록 하겠습니다. 또한, 조직병리학적이나 면역표현형을 기준으로 하는 분류에는 Low-grade, Intermediate-grade, 그리고 high-grade 림프종으로 구분하고 있습니다. Low-grade 림프종의 경우에는 낮은 mitotic rate의 소형세포로서 림프종의 성장이 느리지만, 항암제에 대한 치료반응은 낮은 것으로 알려져 있습니다. 여기에 속하는 대부분의 세포는 T-cell 기원이며, 고-칼슘혈증과 관련이 있다고 보고되어 있습니다. High-grade 림프종의 경우에는 높은 mitotic rate를 보이기 때문에 림프종의 성장이 빠르지만, 항암제의 치료에는 잘 반응하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 B-cell 기원인 것으로 보고되고 있습니다.

### 임상증상

림프종의 임상증상으로는 전형적으로 Peripheral lymphadenopathy가 관찰되며, 식욕감소와 기면, 호흡곤란, 출혈소견, 체중감소, 다음/다뇨, 그리고 구토와 설사증 등이 동반됩니다. 그리고 신체검사 소견으로는 Peripheral lymphadenopathy, 비장이나 간의 종대, 복강 내 물질과 복/흉수, 창백, 출혈반점, 근육의 위축 등이 관찰될 수 있습니다. 검사로는 혈액검사 시, 정-색소성과 정-구성의 비-재생성 빈혈이 관찰될 수 있으며, 용혈성 빈혈도 유발될 수 있습니다. 기타 혈청생화학적 검사, 뇨검사, 흉/복부 방사선 및 초음파 검사가 요구됩니다. 림프종의 진단은 무엇보다도 세침흡인이나 생검을 통한 조직병리학적 검사가 요구됩니다. 이를 통하여 종양의 악성 여부를 1차적으로 판정해 줄 수 있으며, 진단적 특이성과 민감도 또한 매우 높은 편입니다. 필요시 골수의 생검도 요구되고 있습니다.

### 림프종의 평가

림프종은 관련된 림프절이나 장기의 침해 여부에 따라 1에서 5단계까지 구분하고 있으며, 그리고 임상증상의 발현 여부에 따라 substage (a)와 (b)로 세분하여 단계화 하고 있습니다(표 1 참조).

표 1. World Health Organization's 기준의 개 림프종의 Staging 분류기준

Stage (To include anatomic site)
I. Involvement limited to a single node for lymphoid tissue in a single organ.
II. Involvement of many lymph nodes in a regional area (" } tonsils).
III. Generalized lymph node involvement.
IV. Liver and/or spleen involvement (" } stage III)

V. Manifestation in the blood and involvement of bone marrow and/or other organ systems (" } stages I-IV).

Each stage in subclassified into:

(a) without systemic signs

(b) with systemic signs

### 예후 판정

림프종 예후의 판정에는 여러 인자를 종합적으로 고려해서 판정하고 있습니다. 일반적으로 악성의 조직학적 단계, 전신질병의 동반 여부, 고-칼슘혈증, 그리고 화학요법에 대한 반응 여부 등을 통하여 이루어지고 있습니다(표 2 참조).

표 2. 개 림프종의 예후 판정을 위한 인자

Factor	Strongly Accepted	Possibly Accepted	Comments
WHO Clinical Stage		X	Stage I/II-favorable Stage V with significant bone marrow involvement -unfavorable
WHO Clinical Substage	X		Substage b-associated with decreased survival
Histopathology	X		High grade/medium grade-associated with high response rate but reduced survival
Immunophenotype	X		T-cells phenotype-associate with reduced survival
Hypercalcemia		X	Negative factor if associated with T-cell subtype and reduced renal function
Sex		X	Some studies suggest females have a favorable prognosis
Proliferative Index		X	Contradictory reports exists
Prolonged Steroid Pretreatment	X		Most reports suggest females have a favorable prognosis
P-glycoprotein Expression		X	May be associated with poor response rates and shortened remissions
Cranial Mediastinal Lymphadenomegaly	X		Large compilation of cases reports shorter remission and survival duration
Anatomic Location	X		Leukemia, diffuse cutaneous, and alimentary associated with unfavorable prognosis

### 림프종의 치료

림프종을 치료하지 않은 경우 환자의 생존 기간은 약 4-6주 인 것으로 보고되고 있습니다. 하지만, 림프종은 전신적인 항암치료에 매우 좋은 치료반응을 보이는 것으로 알려져 있으며 약 60-90%에 달하는 것으로 알려져 있습니다. 치료에 대한 protocol은 매우 다양하게 제시되고 있으며, 미국의 Wisconsin 수의과대학의 항암치료 protocol을 한 예로서 제시해 드리겠습니다(표 3 참조).

비록 항암요법으로 림프종을 완벽하게 치유하기에는 어려움이 많지만, 이후 임상증상은 대부분 사라진다고 할 수 있습니다(표 4 참조). Prednisone을 단독으로 사용하면 독성이 적고 저렴하다는 장점이 있지만 치료효과가 일시적이며 약제 내성 유발 가능성이 있습니다.

Doxorubicin 단독의 경우에는 비교적 가격도 저렴하고 완전한 치유도 기대(65-75%)할 수 있지만, 심장독성이 유발된 가능성이 있습니다. 일반적으로 림프종의 항암요법에는 Actinomycin D, Mitoxantrone, 그리고 Doxorubicin을 혼용하여 사용하는 protocol이 추천되고 있습니다.

표 3. 미국 Wisconsin-수의과대학의 개 Lymphoma의 항암치료 Protocol (L-VCA-Short)

Week 1	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV., Asparaginase, 400 IU/kg, IM., Prednisone, 2 mg/kg, PO, SID
Week 2	Cyclophosphamide 250 mg/m <sup>2</sup> IV., Prednisone, 1.5 mg/kg, PO, SID
Week 3	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV., Prednisone, 1.0 mg/kg, PO, SID
Week 4	Adriamycin, 30 mg/m <sup>2</sup> IV., Prednisone, 0.5 mg/m <sup>2</sup> PO, SID
Week 6	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 7	Cyclophosphamide 250 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 8	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 9	Adriamycin, 30 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 11	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 13	Cyclophosphamide 250 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 15	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 17	Adriamycin, 30 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 19	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 21	Cyclophosphamide 250 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 23	Vincristine 0.7 mg/m <sup>2</sup> IV
Week 25	Adriamycin, 30 mg/m <sup>2</sup> IV

1. All treatments discontinued after week 25 if in complete remission
2. A CBC should be performed prior to each chemotherapy. If neutrophil count <2,000 wait 5 to 7 days and repeat CBC.
3. If sterile hemorrhagic cystitis occurs on cyclophosphamide, discontinue and substitute leukeran (1.4 mg/kg PO) for subsequently scheduled cyclophosphamide injections
4. Expected CR rate 93%, median survival time of 13 months
5. For all-administer L-asparaginase 40 IU/kg IM with each vincristine injection, until a CR is achieved.

표 4. 항암요법과 관련한 개 림프종의 평균 생존 기간

Protocol	Median survival
Prednisone alone	60 days
COP chemotherapy	180 days
AMC cyclic protocol	219 days

Doxorubicin alone	230 days
LSU protocol	365 days

이밖에도 한정된 부위에 림프종이 발생된 경우에는 수술이나 방사선요법 등과 같은 부분적인 국소요법을 적용할 수 있습니다. 방사선요법의 경우 주로 림프종이 국소적으로 발생하였을 경우나, 약물 치료 후 재발 했을 경우에 적용할 수 있으며, chemotherapy와 함께 병용하면 보다 좋은 치료효과를 얻을 수 있습니다. 정도에 따라 일주일에 3-5번이나 10-16회의 치료가 필요하며, 치료하는 동안 움직임을 방지하기 위해 반드시 마취해야하는 단점이 있습니다.

항암요법 시 중요한 것은 항암요법의 주요한 부작용인 골수억압에 정도를 감시해 주는 것입니다. 이를 위하여 일반혈액검사를 통한 혈중 총-호중구 및 혈소판 수치를 계산하여 각각 호중구의 경우 2,000/ul 이하, 혈소판의 경우 50,000/ul 이하인 경우에는 치료를 중지하고 약 1주일 후에 재검사하여 앞선 수치 이상일 때에 재개하여야 합니다.

### 분자 생물학적 기법을 이용한 림프종의 감별진단

앞서 말씀드린 바와 같이 암은 전통적으로 암세포의 조직병리학적 검사를 이용한 형태학적 기준을 토대로 진단되어져 왔습니다. 사람의 암 진단 방법의 비율을 들어 보더라도 임상소견 및 신체검사 (16%), 조직세포(병리)학적 (현미경적) 검사 83.6 %, 그리고 특수생화학-면역학적 검사 (0.4%)를 위주로 하여 진단되고 있습니다만, 최근 들어 분자생물학적 검사를 이용한 진단법이 활발히 소개되고 있습니다.

암은 다양한 유전적 변화의 결과로 인하여 유발되는 “유전자 변이 질병”이라고 앞서 말씀드린 바 있습니다. 따라서 암세포에서 관찰되는 일반적인 유전적 변화를 미리 파악하고 있다면 이러한 변화를 암의 진단을 위한 “종양 표지자(Cancer Marker)”로 활용할 수 있습니다. 그러면 최근 보고되고 있는 분자생물학적 종양 진단법의 장점을 알아보면, 기존 진단법에 대비하여 검사의 민감성(Sensitive)이 매우 높다고 할 수 있겠습니다. 일반적인 조직병리학적 진단을 위해서는 최소  $1g(10^9)$ 이상의 종양물질이 존재하여야 진단이 가능한 반면, 분자생물학적 진단법은 암세포가  $10^5 \sim 10^6$ 개의 세포중 하나만 있어도 진단이 가능하다고 할 수 있겠습니다. 즉, 임상증상이나 징후가 나타나기 전에 암을 조기-진단할 수 있습니다. 그리고 검사의 특이성(Specific)이 매우 높기 때문에 고-위험군의 screening test로도 활용할 수 있습니다. 또한, 검사의 객관성이 유지되기 때문에 조직병리학적 검사 시 나타날 수 있는 관찰자간의 진단 불-일치도를 개선할 수 있습니다. 그 밖에 말초혈액세포 등 소량의 유핵세포 DNA로도 가능하기 때문에 비교적 비-침습적인 검사방법이라고 할 수 있겠습니다.

현재 암의 종양 표지자에 대한 연구는 매우 활발하게 이루어지고 있습니다. 림프계 종양의 경우, 항원수용체 유전자(antigen-receptor gene)의 재-배열(clonal re-arrangements)이 일반적으로 발생합니다. B-세포 기원의 경우 Immunoglobulin 유전자(heavy-,  $\kappa$  &  $\lambda$  light-chain)에서, T-세포 기원의 경우 항원 receptor 유전자( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -T cell receptor)에서 초기 성숙단계 시, 불연속적 유전자 분절 ( V, J & 일부 D)이 발생된다고 보고되어 있습니다. 따라서 림프종의 경우 이러한 유전자(DNA)의 재배열이 발생하는 현상을 림프계 종양

의 진단 지표로 활용할 수 있다는 것입니다. Melanin cell의 경우 타이로신나제를 지속적으로 생산한다고 알려져 있습니다. 따라서 말초혈액 중에 다량의 타이로신나제 mRNA가 검출된다면 혈중에 순환하는 melanin 종양세포의 존재를 의미할 수 있습니다. 이밖에도 알파태아단백(AFP)이 대표적인 간암 진단 인자로, 전립선과 전립선암 관련한 PSA 항원, 당단백질, 호르몬, 효소, 혈액응고 등 30가지 정도가 혈액과 소변을 이용한 임상검사로 이용되고 있습니다.

한편 유사한 종양의 감별진단에도 활용되고 있는데, 급성 림프구성 백혈병의 경우에는 7.0kb mRNA(190kD 단백질 생산)이, 만성 골수성 백혈병의 경우에는 8.5kb mRNA(210kD 단백질 생산)가 과-발현된다고 하며, 현재 CML blast crisis와 ALL de novo의 유일한 감별법으로 소개되어 있습니다. 또한, 종양의 예후 판정에도 좋은 정보를 제공해 주고 있습니다. 신경아세포종의 N-myc gene은 유전자 이상과 예후의 관련성을 보여주는 가장 좋은 예로서, p53 유전자의 돌연변이는 다양한 종류의 악성 종양의 나쁜 예후 인자로 제시되고 있습니다. 이밖에도 고형종양의 분자생물학적 병기 결정, 미세잔류병변 파악에도 좋은 정보를 제공해 주고 있습니다.

현재 일반적으로 암의 진단에 이용되고 있는 대표적인 분자생물학적 방법으로는 효소중합연쇄반응(PCR; Polymerase Chain Reaction)법입니다. PCR을 이용하게 된다면 이미 알려져 있는 (림프종의 경우 항원수용체 유전자 재-배열) target DNA의 유전자를 지수적으로 증폭할 수 있습니다. 이밖에도 보다 나은 종양 표지자 진단법 개발을 위하여 단클론항체법, 유세포 자동분석기를 이용한 진단법 등이 활발히 연구되고 있습니다. 끝.